91-04217/

Rapports techniques de l'IFNP

Institut forestier national de Petawawa, Chalk River (Ontario) K0J 1J0, Canada

5

TECHNIQUES DE POLLINISATION II. - EXTRACTION ET ENTREPOSAGE DU POLLEN

P.L. Copis
Technologue forestier
Amélioration génétique des arbres

INTRODUCTION

Deuxième d'une série de trois sur les méthodes utilisées à l'Institut pour obtenir des lots de semences par pollinisation contrôlée, la présente note porte sur la manutention du pollen, en particulier les techniques peu coûteuses utilisées à l'Institut pour extraire et entreposer le pollen. Ce rapport comprend des observations sur les épreuves de germination du pollen.

EXIGENCES DU PROGRAMME

Les techniques d'extraction du pollen utilisées à l'Institut sont destinées à des travaux de recherche sur 10 à 25 lots relativement petits de pollen et sur 50 à 100 croisements par année. Le matériel utilisé est simple, mais il donne de bons résultats.

RÉCOLTE DES FLEURS À POLLEN

À la récolte, les microstrobiles sont déposés dans un sac de papier. Chez les genres *Picea* et *Larix*, on détache une partie du rameau ou de la branche qui porte habituellement plusieurs microstrobiles (fig. 1). Parfois, pour contenir le volume de branches recueillies, on utilise un gros sac à ordures en plastique. Avec le genre *Pinus*, seules les grappes de fleurs à pollen ont besoin d'être cueillies. Ces sacs devraient porter un numéro lisible unique qui identifie la source de pollen.

CONDITIONS AMBIANTES

Trois locaux distincts servent à l'extraction du pollen. Dans le premier (par ex. le laboratoire-atelier d'une pépinière), les fleurs à pollen sont étalées dans un panier de treillis métallique ou déposées dans un entonnoir que l'on recouvre solidement. Il importe de ne traiter qu'un lot de pollen à la fois, pour réduire au minimum la contamination entre les lots. À cette étape, on n'a pas à se préoccuper trop de la température et de l'humidité relative ambiantes.

Le plateau ou l'entonnoir passent ensuite dans un local (fig. 2) où le milieu contrôlé favorisera le développement des microstrobiles et la libération du pollen. Le local devrait être obscur, se trouver à une humidité relative de 20 à 40 % et à la température de 25±2 °C. Il doit être bien aéré. Un local distinct, doté d'une hotte, à l'intérieur de laquelle on transvase le pollen, est également utilisé. Les conditions normales d'ambiance (température et éclairage) conviennent à ce local, mais l'humidité relative devrait, de préférence, se situer dans l'intervalle de 20 à 40 %.

EXTRACTION DU POLLEN

Extraction en panier

L'appareil traditionnel d'extraction du pollen est un panier enveloppé de papier emballage brun (fig. 3). Dans le premier local décrit, on a déposé les fleurs à pollen dans un de ces paniers et on a scellé l'emballage au ruban-cache adhésif. On passe dans le deuxième local à ambiance contrôlée où le panier est posé sur une table ou rangé dans une étagère, les coins surélevés, pour que l'air circule tout autour.

Après la libération du pollen, le panier est porté doucement sous la hotte d'un local proche (le troisième local) où, toujours enveloppé de papier, il

Forêts Canada Forestry Canada

Canada

est secoué. Le pollen traverse le treillis métallique et tombe sur le papier.

Le papier est séparé du panier, et le pollen est versé dans un entonnoir d'où il tombe sur un filtre fin (le tissu d'un bas de nylon donne de bons résultats), puis il est recueilli dans une fiole de 50 à 100 ml. On emplit la fiole au tiers pour que le pollen puisse respirer et on la porte immédiatement au dessiccateur pour que le pollen se garde à un taux d'humidité qui conserve son caractère utilisable (poudre sèche). Une humidité excessive fera prendre le pollen en pain et en entraînera la dégradation, d'où l'importance des bonnes conditions d'entreposage et de manutention.

Extraction en entonnoir

La deuxième méthode consiste à utiliser un entonnoir à essence de 30 cm (12 po) de diamètre, en métal, à crépine amovible (du même treillis métallique que le panier d'extraction), dans lequel les fleurs à pollen sont déposées (fig. 4). Entre ce treillis et la tige de l'entonnoir, on trouve un deuxième treillis, plus fin, qui agit comme filtre fin. De la toile ou une autre étoffe qui ne laisse pas passer le pollen ferme le dessus de l'entonnoir tandis qu'une bouteille de verre ou de polyéthylène est fixée de façon hermétique à la tige de l'entonnoir pour recueillir le pollen. L'ensemble est alors rangé sur une étagère dans la pièce à ambiance contrôlée. La manutention du pollen s'effectue sous hotte, et le pollen est conservé dans un dessiccateur, comme il a été décrit.

Un ensemble portatif est constitué d'un entonnoir de métal de 6 po (15 cm) de diamètre doté d'un treillis métallique fin, d'une bonne longueur de boyau à saucisse serré et d'une bouteille réceptrice de 100 ml en polyéthylène (fig. 5). Les fleurs à pollen sont récoltées, déposées dans le dispositif assemblé, tous les points non étanches de l'ensemble étant scellés au ruban-cache. Le dispositif est ensuite rangé dans la pièce à ambiance contrôlée. À l'ouverture des fleurs à pollen, on secoue simplement le sac, et le pollen est recueilli dans la bouteille. Le dispositif a donné de bons résultats sur place ou, dans des stations éloignées, dans une chambre de motel ayant servi de laboratoire. On apporte un dessiccateur pour conditionner et stocker le pollen. Le pollen libéré est utilisé rapidement pour empêcher les problèmes d'humidification.

HYGIÈNE

Une bonne hygiène est nécessaire pour assurer l'intégrité des lots de pollen. Depuis le moment de la récolte des fleurs à pollen jusqu'à l'extraction de ce dernier, il faut prendre des précautions extrêmes pour empêcher la capture de pollen libre qui pourrait contaminer les lots de pollen. Cela signifie qu'il faut traiter un lot de pollen à la fois en s'assurant de couvrir tous les autres lots qui se trouvent dans la même pièce. Il faut également une manipulation très prudente pour empêcher les émissions accidentelles de pollen. En outre, après que le pollen a été extrait et porté au dessiccateur, le matériel, les fleurs à pollen traitées et la hotte doivent être lavés à l'éthanol. L'opération sert à décontaminer la hotte avant d'y admettre le lot suivant et à réduire au minimum la teneur en pollen libre dans la pièce au sortir du matériel de la hotte.

ENTREPOSAGE DU POLLEN

Le pollen destiné à un usage ultérieur doit être entreposé dans de bonnes conditions afin de rester viable. Pour l'entreposage durant la période en cours de pollinisation, la fiole est bouchée au coton et portée au dessiccateur. Ce dernier est rangé dans une pièce froide et obscure ou au réfrigérateur. Au moment de se servir du pollen, on verse la quantité requise dans un entonnoir (sous hotte) dans le récipient d'un applicateur de pollen, que l'on place dans un autre dessiccateur et que l'on apporte sur le terrain. Si le pollen a été gardé au réfrigérateur, on le ramène à la température ambiante avant d'ouvrir le dessiccateur.

Pour un entreposage à long terme (1 an ou plus), le dessiccateur est d'abord mis au réfrigérateur (on recommande une semaine), puis dans un congélateur horizontal à environ -18 ^{o}C. Au moins deux semaines avant la date où le pollen est requis, on sort le dessiccateur du congélateur et on le porte 24 heures au réfrigérateur, puis à la température ambiante avant de l'ouvrir. En ce moment, et avant d'utiliser le pollen, on en prélève un échantillon pour une épreuve de germination (voir la partie suivante). Par cette technique, on a réussi à utiliser du pollen des genres *Pinus* et *Picea* dans le cadre des programmes de l'Institut, après un entreposage d'au moins trois ans.

ÉPREUVE DE GERMINATION DU POLLEN

Owens et Blake (1985) sont d'avis que le pouvoir de germination peut ne pas être une bonne mesure de

Figure 1. Collecte de pollen

Figure 2. Pièce à l'environnement contrôlé

Figure 3. Treillis d'extraction de graines

Figure 4. Entonnoir d'extraction

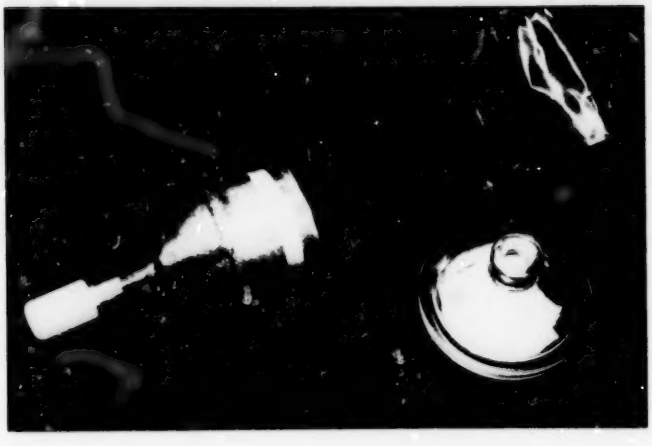

Figure 5. Dispositif portatif d'extraction en forme d'entonnoire

la viabilité du pollen et, d'après l'étude bibliographique qu'ils ont faite, la vitesse de croissance des tubes de pollen donnerait une indication du potentiel de fertilisation. Ces auteurs déclarent également que les épreuves de germination restent toutefois une technique normalisée utile. Ci-après se trouvent des notes sur les techniques utilisées dans les épreuves de germination du pollen des trois genres *Pinus*, *Picea* et *Larix*.

Pinus

On saupoudre légèrement les grains de pollen (à la température ambiante) dans une fiole d'eau distillée. On secoue de façon répétée la fiole pour empêcher l'agglomération des grains. Après deux ou trois jours, on dépose des gouttes d'échantillon sur des lamelles qu'on couvre et qu'on examine sous microscope de dissection (sous agrandissement de 100 X). Il faut évaluer au moins deux fois 50 grains de pollen pour calculer un taux de germination. L'ajout de sucrose à l'eau distillée (ou à d'autre milieu de germination) tend à favoriser la germination du pollen et la croissance de ses tubes. On recommande en moyenne une concentration de sucrose de 10 % (USDA Forest Service, 1981). L'ajout de sucrose pour le pollen de pin n'est pas généralement nécessaire, d'excellents résultats étant obtenus avec l'eau distillée seule.

On considère que la germination a eu lieu lorsque l'allongement du tube de pollen dépasse la dimension la plus courte du grain de pollen. Si le tube de pollen a commencé à se désintégrer, on considère qu'il a germé.

Picea

Avec le pollen des *Picea*, la technique décrite ci-dessus a généralement donné des résultats décevants et inconstants. On a donc opté plutôt pour les épreuves en milieu solide (USDA Forest Service, 1981; OMNR, 1988). On obtient des résultats répétables et des taux élevés de germination du pollen des genres *Picea* et *Pinus* avec la technique suivante :

On porte une solution de 0,6 % de Phytagar (Laboratoires Gibco) et de 5 % de sucrose dans l'eau distillée au four à micro-ondes que l'on règle à la puissance maximale et on laisse bouillir environ 1 min. On laisse refroidir 30 min, on verse dans de petites boîtes de Petri de façon à en couvrir le fond et on laisse se solidifier. Le pollen (ramené à température et à humidité ambiantes) est légèrement saupoudré sur la surface du milieu. Les boîtes de Petri sont couvertes et laissées dans un local chaud sur un papier saturé, à l'abri de la lumière du jour. La détermination du taux de germination doit être faite dans les 24 à 48 heures, à l'aide d'un microscope de dissection.

La réhydratation du pollen conservé, avant l'application de cette méthode, est décrite par l'USDA Forest Service (1981). Il s'agit de ramener l'humidité du pollen à un taux comparable à celui du pollen frais et d'optimiser les résultats de la germination. Pour les besoins des programmes de l'Institut, des résultats acceptables sont obtenus avec du pollen ramené à la température et à l'humidité ambiantes.

Larix

Les tubes de pollen des essences du genre *Larix* ne se développent pas en milieu artificiel, et la détermination du taux de germination est beaucoup plus difficile (USDA Forest Service, 1974). À l'Institut, on n'effectue pas d'épreuve de la germination du pollen des *Larix*.

RÉFÉRENCES

OMNR (Ontario Ministry of Natural Resources). 1988. Pollen management workshop, Orono, Ontario.

Owens, J.N.; Blake, M.D. 1986. Production de semences forestières. Serv. can. for. PI-X-53F.

USDA (United States Department of Agriculture) Forest Service. 1974. Seeds of woody plants in the United States. Agric. Handb. 450.

USDA (United States Department of Agriculture) Forest Service. 1981. Pollen management handbook. Agric. Handb. 587.

This report is available in English

1991

ISSN 1180-5757 ISBN 0-662-96352-0 Catalogue No. Fo29-26/5F

Think recycling

Imprimé sur du papier recyclé

Printed on recycled paper

Pensez à recycler